

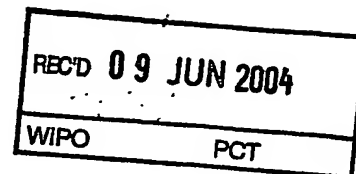
KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN



Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 14 april 2003 onder nummer 1023179,
ten name van:

BEJO ZADEN B.V.

te Warmenhuizen

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Brassica varianten met hoge gehaltes aan anti-carcinogene glucosinolaten",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 18 mei 2004

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

Mw. D.L.M. Brouwer

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding betreft een werkwijze voor het verschaffen van planten welke behoren tot de familie van de Brassicaceae met hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten. De planten worden verkregen door 1) het verschaffen van een Brassica oleracea plant met een verhoogd gehalte aan anti-carcinogene glucosinolaten in de eetbare delen en 2) het gebruik van de onder 1) verschafte Brassica oleracea plant als uitgangsmateriaal voor de veredeling van Brassica variëteiten met hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten.

**BRASSICA VARIANTEN MET HOGE GEHALTES AAN ANTI-CARCINOGENE
GLUCOSINOLATEN**

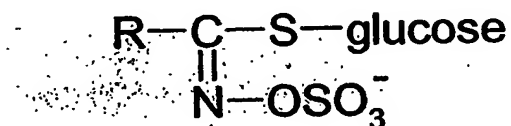
De onderhavige uitvinding betreft een werkwijze voor
5 het verschaffen van planten welke behoren tot de familie van
de Brassicaceae met hoge gehalten aan anti-carcinogene
glucosinolaten. De uitvinding heeft verder betrekking op
Brassica planten welke verkrijgbaar zijn met de methode
volgens de onderhavige uitvinding en evenzo hun zaden en
10 plantdelen. Daarnaast betreft de uitvinding het gebruik van
de Brassica planten voor de bereiding van voedselproducten
en/of farmaceutische samenstellingen welke gebruikt worden
voor de profylaxis en/of behandeling van kanker.

Tot de familie van de Brassicaceae behoort een groot
15 aantal belangrijke tuinbouwgewassen zoals bijvoorbeeld
bloemkool (Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis);
romanesco (Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis);
broccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa);
spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var.
20 asparagoides); spruitkool (Brassica oleracea convar. oleracea
var. gemmifera); witte kool (Brassica oleracea convar.
capitata var. alba); spitskool (Brassica oleracea convar.
capitata var. alba); rode kool (Brassica oleracea convar.
capitata var. rubra); savooiekool (Brassica oleracea convar.
25 capitata var. sabauda); koolrabi (Brassica oleracea convar.
acephala var. gongyloides); boerenkool (Brassica oleracea
convar. acephala var. sabellica); en portugese kool (Brassica
oleracea var. trunchuda syn. costata).

De familie van de Brassicaceae wordt gekenmerkt door
30 de aanwezigheid van typerende secundaire metabolieten welke
een rol spelen bij de geur, de smaak, de voedingswaarde en de
resistentie tegen pathogenen.

Tot deze metabolieten behoren de wateroplosbare chemische verbindingen welke worden aangeduid met de algemene term glucosinolaten. Glucosinolaten kunnen worden onderscheiden in de alifatische glucosinolaten (afgeleid van
 5 het aminozuur methionine), de indolylglucosinolaten (afgeleid van isoleucine of threonine) en de aromatische glucosinolaten (afgeleid van fenylalanine).

De algemene chemische structuur van glucosinolaten wordt schematisch weergegeven door de volgende chemische
 10 formule:



15

Formule 1: algemene chemische structuur van glucosinolaten

waarbij R methionine, isoleucine, threonine, of fenylalanine is, optioneel gemodificeerd of verlengd.

20 De syntheseroute van glucosinolaten in planten is volledig opgehelderd. Een belangrijke rol in de synthese van glucosinolaten speelt het enzym elongase, dat gecodeerd wordt door het gen BoGSL-ELONG. Dit enzym katalyseert de stapsgewijze ketenverlenging van de glucosinolaten. Een
 25 voorbeeld van de in vivo synthese van alifatische glucosinolaten wordt beschreven in figuur 1.

Figuur 1 toont dat het aminozuur methionine omgezet wordt in homomethionine. Met de verbinding homomethionine als uitgangspunt zijn diverse syntheseroutes mogelijk.

30 Rechtstreekse aldoxime vorming leidt bijvoorbeeld tot glucosinolaten met een zijketen van 3 koolstofatomen. Indien elongase voorafgaand aan de aldoxime reactie één of twee

extra verlengingen van de methionine katalyseert ontstaan er glucosinolaten met zijketens van respectievelijk 4 of 5 koolstofatomen. De enzymen betrokken bij de synthese van de glucosinolaten zijn in figuur 1 weergegeven als nummers welke
5 verder worden aangeduid beneden de figuur.

Door als uitgangspunt verschillende aminozuren te gebruiken in combinatie met diverse ketenverlengingen en zijketen modificerende stappen kunnen er een groot aantal verschillende glucosinolaten worden verschaft zoals

10 bijvoorbeeld: glucoiberine

(3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)), progoitrine, sinigrine, glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)), progoitrine, 4-hydroxybrassicine, glucobrassicine, 4-methoxyglucobrassicine en neoglucobrassicine.

15 Bij digestie van de planten van de familie van de Brassicaceae door mens en dier worden de glucosinolaten in het maag-darm kanaal hydrolytisch afgebroken door het enzym myrosinase (mede uitgescheiden door de darmflora) tot een veelvoud van verbindingen zoals bijvoorbeeld nitrilën,
20 isothiocyaten, indolen, aminen, en thiocyaten welke vervolgens worden opgenomen in het lichaam.

Van een aantal van deze afbraakproducten, en met name van de indolen, de isothiocyaten en de thiocyaten, is bekend dat zij gezondheidsbevorderende eigenschappen bezitten
25 en met name anti-carcinogene eigenschappen. In de literatuur is bijvoorbeeld beschreven dat isothiocyaten de activiteit van fase II enzymen induceren waarvan bekend is dat zij betrokken zijn bij de detoxificatie en uitscheiding van schadelijke verbindingen. Daarnaast is bekend dat de
30 isothiocyaten een "programmed cell death" kunnen induceren in carcinoma's. Ook is bekend uit de literatuur dat verhoogde concentraties van indolen en thiocyaten in consumptiegewassen gecorreleerd zijn met een verlaagde kans

tot het ontwikkelen van onder andere darmkanker. Vanwege het gezondheidsbevorderende karakter heeft het gehalte en de soort glucosinolaten in Brassica gewassen al langere tijd de aandacht.

5 Van twee glucosinolaten is met name bekend dat zij, en met name hun afbraakproducten, sterke anti-carcinogene eigenschappen bezitten. Deze glucosinolaten worden in het algemeen aangeduid als glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)) en
10 glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)).

In de tot nu toe bekende literatuur zijn voorbeelden beschreven waarin getracht wordt de gehalten aan glucosinolaten en met name glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)) en glucorafanine
15 (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)) te verhogen.

In het Amerikaanse octrooischrift US 6.340.784 wordt bijvoorbeeld beschreven het gebruik van het verhoogde gehalte glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)) en glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG))
20 waargenomen in de niet-gecultiveerde "wilde" Brassica variëteiten Brassica villosa en B. drepanensis. In dit octrooischrift wordt getracht om deze eigenschappen door middel van kruisingen te introduceren in de gecultiveerde "eetbare" Brassica variëteiten.

25 Echter het gebruik van deze niet-gecultiveerde "wilde" Brassica variëteiten heeft de volgende belangrijke nadelen:

- 1) Door het gebruik van niet-gecultiveerde "wilde" variëteiten kunnen ook niet-gewenste
30 soorten glucosinolaten worden ingebracht in de uiteindelijk verkregen voedingsgewassen. Hierbij kan het bijvoorbeeld gaan om smaakbepalende glucosinolaten, glucosinolaten

met een sterke anti-nutritieve eigenschap, toxische glucosinolaten, enzovoort.

- 2) Naast de introductie van ongewenste glucosinolaten via de niet-gecultiveerde "wilde" Brassica variëteiten in de gecultiveerde "eetbare" Brassica variëteiten kunnen ook andere niet met glucosinolaten geassocieerde en meestal niet bekende eigenschappen worden geïntroduceerd zoals bijvoorbeeld toxinen, verhoogde ontvankelijkheid voor pathogenen, verminderde vruchtbaarheid, een verlaagde opbrengst aan eetbare delen enzovoort.
- 3) Het gebruik van Brassica villosa en B. drepanensis vereist door de relatief grote genetische afstand ten opzichte van de cultuurvariëteiten een zeer langdurig (veelal jaren of zelf decennia) en dus uitermate kostbaar programma van (terug-)kruisingen, selecties, en analyses voor het opnieuw verkrijgen van cultuurwaarde van een Brassica gewas.
- 4) De niet-gecultiveerde "wilde" variëteiten bezitten vaak voor de consument onaantrekkelijke morfologische kenmerken zoals bijvoorbeeld een behaard blad, een onaantrekkelijke kleur, afwijkende niet herkenbare eetbare plantdelen, enzovoort.

In het kader van de introductie van ongewenste eigenschappen uit niet-gecultiveerde "wilde" Brassica variëteiten in gecultiveerde "eetbare" variëteiten is het interessant om te wijzen op de praktijk van de Brassica napus veredeling waar een verlaging van bepaalde schadelijke

glucosinolaten een doel op zich is met betrekking tot het verkrijgen van cultuurgewassen.

Dit geldt het sterkst voor gewassen die bedoeld zijn als veevoeder. Indien grote hoeveelheden van dergelijke
5 schadelijke glucosinolaten opgenomen worden in het dier treden er schadelijke bijwerkingen op zoals bijvoorbeeld in de schildklier. Accumulatie van glucosinolaten in de
schildklier interfereert met de synthese van het
schildklierhormoon. Daarnaast remmen de thiocyanaten de
10 opname van jodium verbindingen door de schildklier.

Het is daarom een doel van de onderhavige uitvinding gecultiveerde "eetbare" planten te verschaffen welke behoren tot de familie van de Brassicaceae met hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten zonder de hierboven
15 beschreven nadelen.

Dit doel wordt volgens de uitvinding bereikt met de Brassica planten welke worden verschaft door de werkwijze zoals beschreven is in conclusie 1. Conclusie 1 beschrijft een werkwijze, welke omvat:

- 20 a) het verschaffen van een Brassica oleracea plant met een verhoogde hoeveelheid anti-carcinogene glucosinolaten in de eetbare delen van de Brassica oleracea plant;
- b) het gebruik van de onder a) verschaft Brassica
25 oleracea plant als uitgangsmateriaal voor de veredeling van Brassica variëteiten met hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten.

Van planten welke behoren tot de Brassica oleracea groep is bekend dat zij veilig zijn voor de consumptie ("safe
30 use") door mens en dier. Dit betekent in de praktijk dat algemeen wordt aangenomen dat deze planten geen voor mens en dier schadelijke verbindingen bevatten. Door het gebruik gedurende vele eeuwen van deze plantengroep is ook bekend dat

zij zelfs bij langdurige consumptie (vele decennia) nog steeds geen schadelijke bijwerkingen veroorzaken. Hierdoor wordt de kans op de introductie van niet gewenste eigenschappen zoals bijvoorbeeld andere schadelijke of ongewenste glucosinolaten of toxinen tot een minimum beperkt en zelfs waarschijnlijk tot nul gereduceerd.

Veel groentegewassen welke behoren tot de Brassicaceae familie behoren tot de Brassica oleracea groep. Door de relatief kleine of zelfs bijna geheel afwezige genetische afstand van de verschafte Brassica oleracea plant volgens de onderhavige uitvinding ten opzichte van de verkregen gecultiveerde "eetbare" Brassica oleracea planten met hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten kunnen deze laatste eenvoudig worden verkregen volgens stap b) waarbij via kruisingen genetisch materiaal wordt uitgewisseld.

Ook levert het gebruik van een plant behorende tot de Brassica oleracea groep geen door de consument als onaangenaam ervaren "eetbare" planten of plantdelen op.

Het verschaffen van een Brassica oleracea plant met een verhoogde hoeveelheid anti-carcinogene glucosinolaten in de eetbare delen kan op vele manieren geschieden.

Een dergelijke plant kan bijvoorbeeld worden verschaft door gebruik te maken van moleculaire markers (hybridisatie, "restriction fragment length polymorphism" (RFLP), PCR) en in het bijzonder door gebruik te maken van moleculaire markers welke geassocieerd zijn met genen welke coderen voor enzymen welke betrokken zijn bij de synthese van glucosinolaten met een anti-carcinogene werking. Dergelijke enzymen zijn bekend aan de gemiddeld geschoolde vakman omdat de syntheseroute van glucosinolaten geheel is opgehelderd (zie ook figuur 1).

Een andere mogelijkheid voor het verschaffen van een Brassica oleracea plant volgens de onderhavige uitvinding is een analyse van de expressieniveau's van genen en met name van die genen welke coderen voor enzymen welke betrokken zijn bij de synthese van glucosinolaten. Een verlaagde of verhoogde expressie van een specifiek gen kan indicatief zijn voor de verhoogde concentratie van glucosinolaten met een anti-carcinogene werking. Er zijn vele werkwijzen beschikbaar in het vakgebied, zoals bijvoorbeeld "real-time PCR", "Northern Blot analyse", "quantitative PCR" enzovoort, welke allen behoren tot de praktische vaardigheden en de kennis van een gemiddeld geschoolde vakman.

Het is ook mogelijk om een Brassica oleracea plant volgens a) te verschaffen door middel van een biochemische bepaling van de concentratie anti-carcinogene glucosinolaten. Een voorbeeld van een dergelijke biochemische bepaling is "High Performance Liquid Chromatography" kortweg aangeduid als HPLC. De concentratie en de aard van de glucosinolaten aanwezig in een specifieke Brassica oleracea plant kunnen eenvoudig bepaald worden met behulp van het chromatogram welke de gedetecteerde gegevens van de HPLC grafisch weergeeft. Andere biochemische werkwijzen zijn bijvoorbeeld kleuring van specifieke glucosinolaten, immunologische werkwijzen welke specifieke glucosinolaten zichtbaar maken in weefselmonsters, massaspectrometrie, NMR, infraroodabsorptie analyse enzovoort.

Een Brassica oleracea plant volgens de onderhavige uitvinding kan ook worden verschaft door gebruik te maken van moderne moleculair biologische werkwijzen. Deze werkwijzen kunnen bijvoorbeeld gebruikt worden voor de in vivo beïnvloeding van de expressie van genen welke coderen voor enzymen welke betrokken zijn bij de biosynthese van glucosinolaten. Voorbeelden van dergelijke werkwijzen zijn

"knock-out", "knock-in", "RNA silencing", "anti-sense" mRNA enzovoort.

Na het verschaffen van de Brassica oleracea plant met een verhoogde hoeveelheid anti-carcinogene glucosinolaten kan
 5 deze gebruikt worden voor het introduceren van deze eigenschap in planten welke behoren tot de familie van de Brassicaceae. Mogelijke veredelingswerkwijzen zijn bijvoorbeeld kruisingen, antherencultuur, microsporencultuur, protoplastenfusie, en genetische modificatie, deze zijn
 10 algemeen bekend in het vakgebied zodat de gemiddelde geschoolde vakman eenvoudig een keuze kan maken met betrekking tot de meest efficiënte werkwijze.

Volgens één uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding zijn de glucosinolaten met een anti-carcinogene
 15 werking de glucosinolaten glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)) en/of glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)). Deze glucosinolaten bezitten een zeer krachtige anti-carcinogene werking en zijn dus met name geschikt om gebruikt
 20 te worden volgens de onderhavige uitvinding.

Voor het verhogen van de kans tot het verschaffen van een plant behorende tot de Brassicaceae familie met hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten is de
 hoeveelheid glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat
 25 (3MSPG)) per 100 gram versgewicht eetbaar deel bij voorkeur hoger dan 100 micromol, meer de voorkeur geniet hoger dan 280 micromol, en meest de voorkeur geniet hoger dan 390 micromol. Immers, er bestaat altijd een kans dat tijdens de hierboven genoemde stap b) een deel van de oorspronkelijk verschafte
 30 hoge gehalten aan anti-carcinogene glucosinolaten wordt verloren.

Dit geldt ook met betrekking tot glucorafanine

(methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)). Volgens de onderhavige uitvinding is de hoeveelheid glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)) per 100 gram versgewicht eetbaar deel bij voorkeur hoger dan 50 micromol, 5 meer de voorkeur geniet hoger dan 120 micromol, en meest de voorkeur geniet hoger dan 140 micromol.

Een aantal Brassica oleracea rassen zijn met name geschikt om gebruikt te worden in de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding. Dit zijn de savooiekool (Brassica 10 oleracea convar. capitata var. sabauda), de broccoli ((Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa), en de spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides) van deze rassen is bijzonder geschikt spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. 15 asparagoides).

De consument heeft een voorkeur voor de consumptie van verse groenten. Hierdoor verschaft het gebruik spruitbroccoli een voorkeur omdat dit ras een zeer goede koude tolerantie bezit waardoor het ras gedurende het gehele 20 jaar gekweekt kan worden. Hierdoor wordt verschaft een constante (gedurende het hele jaar) aanvoer van verse groenten. Bovendien geniet voor de consument spruitbroccoli de voorkeur door zijn bekende morfologie.

Specifiek de voorkeur genieten de respectievelijke 25 variëteiten van de rassen Wiroso (savooiekool, bijlage 1), Belstar (broccoli, bijlage 2), Coronado (broccoli, bijlage 3) en Bordeaux (spruitbroccoli, bijlage 4). Deze rassen worden gekarakteriseerd volgens de bijbehorende beschrijvingen van deze variëteiten volgens artikel 11, paragraaf 2 van de 30 vegetatieve zaad richtlijn van de Europese Gemeenschap (70/458/CEE).

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is met name geschikt voor het verschaffen van planten welke behoren

tot de Brassicaceae familie welke planten worden gekozen uit de groep welke bestaat uit bloemkool (Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis); romanesco (Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis); broccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa); spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides); spruitkool (Brassica oleracea convar. oleracea var. gemmifera); witte kool (Brassica oleracea convar. capitata var. alba); spitskool (Brassica oleracea convar. capitata var. alba); rode kool (Brassica oleracea convar. capitata var. rubra); savooiekool (Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda); koolrabi (Brassica oleracea convar. acephala var. gongyloides); boerenkool (Brassica oleracea convar. acephala var. sabellica); en portugese kool (Brassica oleracea var. trouchuda syn. costata).

De Brassica planten welke worden verschaft door de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding hebben bijzonder gewenste eigenschappen ten opzichte van planten die bekend zijn uit de stand van de techniek en met name gelet op hun hoge gehaltes aan anti-carcinogene glucosinolaten. De onderhavige uitvinding heeft daarom ook betrekking op planten, zaden en plantdelen welke verkrijgbaar zijn volgens de werkwijze zoals hierboven beschreven is.

Door hun anti-carcinogene eigenschappen zijn de planten volgens de onderhavige uitvinding met name geschikt om gebruikt te worden voor de bereiding van een voedselproduct of farmaceutische samenstelling voor de profylaxis en/of behandeling van kanker. Hierbij kan gedacht worden aan bijvoorbeeld voedselproducten in de vorm van salades, sap, repen, maaltijden, snacks, enzovoort. Voor farmaceutische samenstellingen kunnen de planten bijvoorbeeld verwerkt worden in tabletten, injecteerbare vloeistoffen,

zetpillen, capsules, suspensies, dragers, "sustained release" dragers, enzovoort.

De onderhavige uitvinding zal hierna verder worden toegelicht aan de hand van voorbeelden welke geenszins zijn bedoeld om de uitvinding op enigerlei wijze te beperken en slechts dienen om mogelijke uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding te illustreren.

VOORBEELDEN

10

Voorbeeld 1. uitgangsmateriaal:

Planten van de verschillende Brassica oleracea genotypen (zie tabel 1) zijn allen op hetzelfde veld opgegroeid en dus onder dezelfde weersomstandigheden en een gelijk voedingsregime. Alle planten ontvingen dezelfde hoeveelheid kunstmatige bemesting (zie tabel 2). In totaal werden 41 verschillende Brassica oleracea genotypen gebruikt.

TABEL 1. Gebruikte Brassica oleracea genotypen

		Zaaidatum	Plantdatum	Monstername
	witte kool			
5	Almanac	20 maart	13 mei	23 oktober
	Krautman	20 maart	13 mei	23 oktober
	Mentor	20 maart	13 mei	23 oktober
	Mandy	20 maart	13 mei	23 oktober
	Lennox	20 maart	14 mei	23 oktober
10	Deense 11-2	20 maart	14 mei	23 oktober
	rode kool			
	Integro	1 mei	4 juni	2 oktober
	Azurro	13 maart	13 mei	23 oktober
	Huzaro	14 maart	13 mei	23 oktober
15	Buscaro	13 maart	13 mei	23 oktober
	Pesaro	13 maart	13 mei	23 oktober
	Spitskool			
	Bejo 2574	14 juni	15 juli	2 oktober
	Bejo 2575	28 juni	29 juli	2 oktober
20	Capricorn	14 juni	15 juli	2 oktober
	koolrabi			
	Kolibri	12 juli	13 augustus	8 oktober
	Korist	12 juli	13 augustus	8 oktober
	broccoli			
25	Lucky	21 juni	25 juli	2 oktober
	Alborada	21 juni	25 juli	2 oktober
	Belstar	21 juni	25 juli	2 oktober
	Surveyor	21 juni	25 juli	2 oktober
	Coronado	21 juni	25 juli	8 oktober
30	Bordeaux	14 juni	16 juli	14 november
	bloemkool			
	Jerez	7 juni	9 juli	2 oktober
	Cassius	7 juni	9 juli	2 oktober
	Encanto	7 juni	9 juli	2 oktober
35	Skywalker	31 mei	4 juli	2 oktober
	Panther	7 juni	8 juli	2 oktober

	Zaaidatum	Plantdatum	Monstername
5	romanesco		
	Bejo 1955	8 juli	2 oktober
	Veronica	8 juli	2 oktober
	Amfora	8 juli	2 oktober
5	boerenkool		
	Ripbor	13 juni	23 oktober
	Redbor	13 juni	23 oktober
10	spruitkool		
	Franklin	24 april	8 oktober
	Nautic	24 april	23 oktober
	Maximus	24 april	23 oktober
	Glenroy	24 april	23 oktober
	Doric	24 april	23 oktober
	Dominator	24 april	14 november
	Revenge	24 april	14 november
15	savooiekool		
	Ovasa	5 juni	2 oktober
	Wirosa	5 juni	2 oktober

20 TABEL 2. bemestinggegevens

Op 21 maart 2002 is een stikstofmonster genomen; het perceel waar de Brassica planten geplant zijn heeft een eigen voorraad van 70 kg zuivere stikstof.

25	Element	Zuivere meststof	Kunstmestsoort	Hoeveelheid
	magnesium	25 kg/ha	kieseriet	100 kg/ha
	fosfaat	300 kg/ha	tripelsuperfosfaat	700 kg/ha
	kalium	300 kg/ha	patentkali	1000 kg/ha
	stikstof	200 kg/ha	kalkammonsalpeter	500 kg/ha

30

Voorbeeld 2. bemonstering

Van iedere opgegroeide variëteit volgens tabel 1 werden van 5 verschillende planten of plantendelen (blad, spruiten, bloemkroon) geoogst. Hierbij is vermeden de planten

35 van de buitenste rij te nemen om randeffecten te vermijden.

Van de witte kool variëteiten werden 3 hele kolen geoogst. Van iedere kool werden twee tegenover elkaar gelegen gedeeltes genomen, elk ter grootte van 1/8 deel van de kool.

Bij de broccoli variëteiten werden van de verschillende

5 planten 3 roosjes uit het midden en de rand gesneden. Bij spruiten zijn telkens twee tegenoverliggende kwarten als monster genomen.

De monsters werden vervolgens met behulp van vloeibare stikstof ingevroren en tot poeder vermalen. Dit
10 poeder werd opgeslagen bij -20°C voor verdere bewerking en analyse.

Voorbeeld 3. Extractie van glucosinolaten.

5 gram poeder van het poeder verkregen in voorbeeld 2
15 werd afgewogen en overgebracht in 50 ml centrifugebuizen en deze werden in een waterbad verwarmd tot 75°C . Hierna werd aan de buizen toegevoegd 12 ml kokende methanol (100%) en de suspensie werd gemengd. Daarnaast werd onmiddellijk toegevoegd 1.0 ml 3mM glucotropaeoline als interne standaard.

20 Het monster werd geëxtraheerd gedurende minimaal 20 minuten in een waterbad van 75°C en regelmatig geschud. Hierna werden de vaste delen gepelleteerd door middel van centrifugatie (10 minuten, $5000\times g$) bij kamertemperatuur en het supernatant werd overgebrachte naar een schone centrifuge
25 buis. De hierboven extractie werkwijze werd nog tweemaal uitgevoerd op het verkregen supernatant met telkens een 10 ml kokende oplossing van methanol (70%). Het verkregen extract werd opgeslagen bij -20°C .

Voorbeeld 4. Desulfateren van glucosinolaten

30 10 gram DEAE Sephadex A-25 poeder werd afgewogen en hieraan werd toegevoegd 80 ml 2M azijnzuur waarna de suspensie overnacht werd weggezet zonder roering bij

kamertemperatuur. Het volume van de suspensie werd hierna verdubbeld door de toevoeging van 2 M azijnzuur. Een 2 ml injectiespuit werd aan de onderkant afgesloten met een prop van glaswol. Hierin werd voorzichtig de DEAE Sephadex
5 suspensie gebracht totdat er een kolom van circa 1,5 ml was gevormd. De gevulde injectiespuit werd vervolgens overgebracht in een 10 ml reageerbuis. De kolom werd hierin tweemaal gewassen met 1 ml water.

Op de verkregen kolom werd doorgevoerd circa 2 ml van
10 het supernatant verkregen volgens voorbeeld 3. Vervolgens werd de kolom tweemaal gewassen met 1 ml 20 mM NaAc-oplossing (pH 4.0). De kolom werd overgebracht in een schone buis en 75 µl verse sulfatase oplossing (25 mg Sulfatase type H-1 (Sigma S-9626)/ml bidest) werd doorgevoerd door de kolom. Men
15 liet dit enzym gedurende een nacht inwerken bij kamertemperatuur. Vervolgens werden de gedesulfateerde glucosinolaten geëlueerd met 3 x 0,5 ml bidest en de gecombineerde fracties werden gefiltreerd over een 0,45 µm filter (13mm, Alltech)

20

Voorbeeld 5. HPLC analyse

Voor High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyse werd gebruik gemaakt van apparatuur welke de
mogelijkheid heeft voor een gradiënt-elutie. Gekoppeld aan
25 dit apparaat is een UV-detector met een gebruikte golflengte van 229 nm. Als voorkolom werd gebruikt een Alltech Optiguard® 1 mm reversed phase C18 reversed phase kolom. Als
scheidingskolom werd gebruikt een Novapak C18 kolom.

De gebruikte eluentia voor de kolom waren als volgt
30 samengesteld:

- 1) Eluent A: 0,05% Tetramethylammoniumchloride (Merck).

- 2) Eluent B: 0,05% Tetramethylammoniumchloride
in H₂O/Acetonitril (80/20 v/v).

Het injectievolume was 20 µl en de totale doorstroomsnelheid werd constant gehouden op 1,0 ml/min. Het gradiëntprofiel

5 waarmee de eluentia door de kolom passeerden was als volgt:

Tijd (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	0
1	100	0
21	0	100
26	100	0
31	100	0

10 Na passeren van het eluent door de kolom werd de E₂₂₉ gemeten
15 met behulp van een UV detector.

Voorbeeld 6. gebruikte referentiemonsters

Voor interne referentie werden de volgende interne standaarden gebruikt.

- 20 a) Glucotropaeoline (KLV, Denemarken)
b) Sinigrine
c) Gluconasturtiin
d) Spruit (Cyrus)
e) Koolzaad (Colza; BCR referentiemonster; No. 367R)

25

Voorbeeld 7. bepaling van het glucosinolaatgehalte

De bepaling van het gehalte aan glucosinolaten (GLS) werd uitgevoerd ten opzichte van de interne standaard (IS) en wordt uitgedrukt in micromol/100 gram vers gewicht. De

- 30 relatieve respons factor (RRF) ten opzichte van glucotropaeoline van de gemeten stoffen werd bepaald. Deze gegevens worden samengevat in tabel 3. Hierna werd de concentratie glucosinolaten in elk monster bepaald waarbij

gecorrigeerd werd met de gevonden relatieve responsfactor. De resultaten worden weergegeven in Tabel 4.

TABEL 3 De relatieve responsfactoren ten opzichte van

5 glucotropaeoline

DESULFOGLUCOSINOLAAT	GLUCOTROPAEOLINE
glucoiberin	1,126
progoitrin	1,147
10 sinigrin	1,053
glucoalyssin	1,13
glucoraphanin	1,126
gluconapoleiferin	1,00
gluconapin	1,168
15 4-hydroxyglucobrassicin	0,295
glucotropaeolin	-
glucobrassicin	0,526
glucosturtiin	1,00
4-methoxyglucobrassicin	0,26
20 neoglucobrassicin	0,21

TABEL 4 Gemeten glucosinolaten gehalten in geteste Brassica oleracea genotypen.

25 Alle waarden zijn in duplo gemeten en uitgedrukt als micromol glucosinolaten per 100 gram vers gewicht. In de literatuur wordt het glucosinolaten gehalte vaak weergegeven als micromol/gram drooggewicht. De gemeten waarden en de waarden gevonden in de literatuur kunnen tot elkaar herleid worden met de volgende omrekenfactor: kool heeft een droge stof

30 gehalte van 7-15%; gemiddeld 10%. 100 gram versgewicht komt dus (gemiddeld) overeen met 10 gram drooggewicht; de waarden in de tabel moet dus door 10 gedeeld om met literatuurwaarden te vergelijken.

		glucoiberine (3MSPG)	3MSPG (%)	glucorafanine (4MSBG)	4MSBG (%)	overige glucosino- laten	totaal glucosino- laten
	Witte kool						
	Almanac	24,8	19,5%	18,9	14,9%	83,2	126,9
	Krautman	67,7	39,2%	1,9	1,1%	102,9	172,5
5	Mentor	57,6	23,9%	3,1	1,3%	180,3	241,0
	Mandy	100,0	42,9%	28,3	12,1%	105,0	233,3
	Lennox	109,0	53,7%	18,8	9,3%	75,3	203,1
	Deense 11-2	60,7	31,5%	3,8	2,0%	127,9	192,4
	Rode kool						
10	Integro	19,3	12,5%	33,9	22,0%	100,6	153,8
	Azurro	13,8	14,8%	7,2	7,7%	72,0	93,0
	Huzaro	13,1	7,7%	61,8	36,4%	94,9	169,8
	Buscaro	36,4	15,1%	38,9	16,2%	165,0	240,3
	Pesaro	31,2	14,6%	43,5	20,4%	138,9	213,6
15	Spitskool						
	Bejo 2574	28,1	20,6%	0,7	0,5%	107,9	136,7
	Bejo 2575	72,0	43,6%	9,2	5,6%	84,1	165,3
	Capricorn	31,2	36,8%	5,0	5,9%	48,6	84,8
	Koolrabi						
20	Kolibri	12,8	23,3%	28,8	52,4%	13,4	55,0
	Korist	6,4	46,0%	0,0	0,0%	7,5	13,9
	Broccoli						
	Lucky	20,6	21,3%	35,8	37,0%	40,4	96,8
25	Alborada	25,8	18,1%	69,0	48,4%	47,7	142,5
	Belstar	26,1	11,2%	129,7	55,5%	77,9	233,7
	Surveyor	26,1	18,8%	57,8	41,7%	54,7	138,6
	Coronado	52,1	19,7%	140,7	53,1%	72,1	264,9
	Bordeaux	395,6	74,2%	26,7	5,0%	110,9	533,2
30	Bloemkool						
	Jerez	16,8	36,5%	2,8	6,1%	26,4	46,0
	Cassius	7,6	24,4%	0,7	2,3%	22,8	31,1
	Encanto	10,5	25,2%	0,0	0,0%	31,1	41,6
	Skywalker	10,2	31,4%	0,0	0,0%	22,3	32,5
35	Panther	34,2	57,8%	7,9	13,3%	17,1	59,2
	Romanesco						
	Bejo 1955	25,4	54,9%	2,1	4,5%	18,8	46,3
	Veronica	15,9	32,9%	12,4	25,6%	20,1	48,4
	Amfora	13	24,4%	16,0	30,1%	24,2	53,2

	glucoiberine (3MSPG)	3MSPG (%)	glucorafanine (4MSBG)	4MSBG (%)	overige glucosino- laten	totaal glucosino- laten
Boerenkool						
Ripbor	35	35,0%	1,7	1,7%	63,4	100,1
Redbor	23,4	14,6%	0,0	0,0%	136,4	159,8
Spruitkool						
Franklin	51,1	9,9%	28,9	5,6%	437,3	517,3
Nautic	37	11,5%	41,8	13,0%	243,2	322,0
Maximus	91,5	31,9%	22,8	8,0%	172,2	286,5
Glenroy	43,6	12,9%	11,7	3,5%	283,1	338,4
Doric	38,2	6,7%	26,4	4,6%	504,1	568,7
Dominator	83,3	13,3%	9,2	1,5%	532,4	624,9
Revenge	47,5	9,9%	8,5	1,8%	422,9	478,9
Savooiekool						
Ovasa	55	54,3%	0,7	0,7%	45,8	101,5
Wirosa	284,8	59,7%	7,8	1,6%	183,8	476,4

Uit tabel 4 blijkt duidelijk het hoge gehalte aan glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)) in de Bordeaux (spruitbroccoli), de Lennox (witte kool), de Mandy (witte kool) en de Wirosa (savooie kool), respectievelijk 395,6 micromol, 284,8 micromol, 109,0 micromol, en 100,0 micromol. Een hoog gehalte aan glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG)) is aanwezig in de variëteiten Coronado (broccoli), Belstar (broccoli), Alborada (broccoli), en Huzaro (rode kool), respectievelijk 140,7 micromol, 129,7 micromol, 69,0 micromol en 61,8 micromol.

Bijlage I Wirosa

N E D E R L A N D

FORM II

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij - Bezuidenhoutseweg 73 - Den Haag

SUBJECT: Information according to article 11 par. 2 of the vegetable seed directive (70/458/CEE):
ADMISSION OF A NEW VARIETY

1. Species: Brassica oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda DC.
- Savooienkool
2. Variety: Wirosa
3. Maintainer: NL 8 - Bejo Zaden B.V.
4. Date of admission:
5. Indication of the variety: b
6. Short description of the variety:

UPOV richtlijn: TG/48/6

UPOV nr	Kenmerk	Klasse	Code	Opmerkingen
	Kiemplant: anthocyaan kleuring hypocotyl	aanwezig	9	
1	Plant: hoogte	laag tot gemiddeld	4	
2	Plant: maximum diameter (incl. omblad)	-	-	
3	Plant: lengte uitwendige stronk	kort tot gemiddeld	4	
4	Plant: houding omblad	halfopgericht	5	
5	Omblad: grootte	-	-	
6	Omblad: vorm schijf	rond	3	tot br.omgekeerd eivormig
7	Omblad: profiel bovenzijde schijf	komvormig	1	zwak
8	Omblad: bobbeling	gemiddeld tot sterk	6	fijn
9	Omblad: bobbelgrootte	klein	3	
10	Omblad: plooiing	-	-	
11	Omblad: kleur (met waslaag)	grijsgroen	3	
12	Omblad: kleurintensiteit	donker	7	
14	Omblad: waslaag	sterk	7	
15	Omblad: golving rand	zwak	3	
16	Omblad: insnijding bladrand	-	-	
17	Omblad: ombuiging bladrand	-	-	
	Kool: grootte	klein tot gemiddeld	4	
18 G	Kool: vorm lengtedoorsnede	platrond	2	tot rond
19	Kool: vorm basis	-	-	
20	Kool: lengte	kort	3	tot middellang
21	Kool: diameter	klein tot gemiddeld	4	
22	Kool: plaats grootste diameter	boven midden	1	tot op het midden
23	Kool: sluiting	halfgesloten	2	
24	Kool: bobbeling dekblad	gemiddeld	5	
25	Kool: ombuiging dekblad	-	-	
26	Kool: kleur dekblad	groen	2	
27	Kool: intensiteit kleur dekblad	licht tot gemiddeld	4	
28	Kool: anthocyaan op dekblad	zwak	3	
29	Kool: inwendige kleur	-	-	
31	Kool: vastheid	vast	7	
32	Kool: inwendige structuur	-	-	
33	Kool: lengte inwendige stronk	lang	7	
34 G	Oogstrijpheid	laat	7	
35	Barsten kool na oogstrijpheid	-	-	
36	Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans fysio	-	-	
1				

Onderscheidbaarheid:

Lijkt het meest op Hiversa, maar heeft een kortere stronk,
een vlakke bladstand en een vroegere koolvorming.

7. Denomination in trials:

Wirosa

Bijlage II Bordeaux

N E D E R L A N D
Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij - Bezuidenhoutseweg 73 - Den Haag

FORM II

SUBJECT: Information according to article 11 par. 2 of the vegetable seed directive (70/458/CEE):
 ADMISSION OF A NEW VARIETY

1. Species: Brassica oleracea L. convar. botrytis (L) Alef. var. cymosa Duch.
 - Broccoli
 2. Variety: Belstar
 3. Maintainer: NL 8 H Bejo Zaden B.V.
 4. Date of admission: 17/08/2000
 5. Indication of the variety: b
 6. Short description of the variety:

UPOV richtlijn: TG/151/3

UPOV nr	Kenmerk	Klasse	Code	Opmerkingen
1	Plant: aantal stengels	6én	1	
2	Plant: hoogte	gemiddeld	5	
3	Blad: houding	halfopgericht	3	
4	Blad: lengte	gemiddeld	5	
5	Blad: breedte	gemiddeld	5	
	Blad: vorm	elliptisch	5	
6	Blad: aantal lobben	weinig	3	
7	Bladschijf: kleur	grijsgroen	2	
8	Bladschijf: kleurintensiteit	gemiddeld	5	
	Blad: waslaag	gemiddeld	5	
9	Bladschijf: anthocyaankleuring	afwezig	1	
10	Bladschijf: golving rand	zwak	3	
11	Bladschijf: tanding rand	zeer ondiep tot ondiep	2	
12	Bladschijf: bobbeling	zwak	3	
	Bladschijf: bobbelgrootte	gemiddeld tot groot	6	
13	Bladsteel: anthocyaankleuring	afwezig	1	
14	Bladsteel: lengte	gemiddeld	5	
15	Bloemhoofd: lengte vertakkingen aan basis	kort	3	
16	Bloemhoofd: grootte	gemiddeld	5	
17	Bloemhoofd: vorm	rond	1	tot platrond
18 G	Bloemhoofd: kleur	grijsgroen	3	
19	Bloemhoofd: kleurintensiteit	gemiddeld	5	
20	Bloemhoofd: anthocyaankleuring	afwezig	1	
21	Bloemhoofd: intensiteit anthocyaankleuring	-	-	
22	Bloemhoofd: bonkigheid	fijn tot gemiddeld	4	
23	Bloemhoofd: korreligheid	fijn tot gemiddeld	4	
24	Bloemhoofd: vastheid	vast	7	
25	Bloemhoofd: bracteeën	afwezig	1	
26	Plant: secundaire bloemhoofden	aanwezig	9	
27	Plant: mate van secundaire bloemhoofden	zeer zwak tot zwak	2	
28	Bloem: kleur	geel	2	
29	Bloem: intensiteit geelkleur	gemiddeld tot donker	6	
30	Oogstrijpheid	laat	7	tot gemiddeld
31	Begin bloei	gemiddeld tot laat	6	
	Type	eenjarig	1	

Onderscheidbaarheid:

Staat op zichzelf. Het ras wordt gekenmerkt door het zwak gelobde blad, het middelgrijsgroene bloemhoofd met fijne tot gemiddelde korreligheid en de tamelijk late oogstrijpheid.

7. Denomination in trials:

Bejo 1848

Bijlage III Belstar

N E D E R L A N D
Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij - Bezuidenhoutseweg 73 - Den Haag

FORM II

SUBJECT: Information according to article 11 par. 2 of the vegetable seed directive (70/459/CEE):

ADMISSION OF A NEW VARIETY

1. Species: Brassica oleracea L. convar. botrytis (L) Alef. var. cymosa Duch.
 - Broccoli
2. Variety: Coronado
3. Maintainer : NL 8 H Bejo Zaden B.V.
4. Date of admission: 30/04/1997
5. Indication of the variety: b
6. Short description of the variety:

UPOV richtlijn: TG/151/3

UPOV nr	Kenmerk	Klasse	Code	Opmerkingen
1	Plant: aantal stengels	één	1	
2	Plant: hoogte	gemiddeld	5	
3	Blad: houding	halfopgericht	3	
4	Blad: lengte	gemiddeld	5	
5	Blad: breedte	gemiddeld tot breed	6	
	Blad: vorm	elliptisch tot breed elliptisch	6	
6	Blad: aantal lobben	gemiddeld	5	
7	Bladschijf: kleur	grijsgroen	2	
8	Bladschijf: kleurintensiteit	gemiddeld tot donker	6	
	Blad: waslaag	sterk	7	
9	Bladschijf: anthocyaankleuring	afwezig	1	
10	Bladschijf: golving rand	zeer zwak tot zwak	2	
11	Bladschijf: tanding rand	ondiep	3	
12	Bladschijf: bobbeling	zeer zwak tot zwak	2	
	Bladschijf: bobbelgrootte	gemiddeld	5	
13	Bladsteel: anthocyaankleuring	afwezig	1	
14	Bladsteel: lengte	kort tot gemiddeld	4	
15	Bloemhoofd: lengte vertakkingen aan basis	kort	3	
16	Bloemhoofd: grootte	gemiddeld	5	
17	Bloemhoofd: vorm	rond	1	
18	G Bloemhoofd: kleur	grijsgroen	3	
19	Bloemhoofd: kleurintensiteit	gemiddeld tot donker	6	
20	Bloemhoofd: anthocyaankleuring	afwezig	1	
21	Bloemhoofd: intensiteit anthocyaankleuring	-	-	
22	Bloemhoofd: bonkigheid	gemiddeld	5	
23	Bloemhoofd: korreligheid	fijn tot gemiddeld	4	
24	Bloemhoofd: vastheid	gemiddeld	5	
25	Bloemhoofd: bracteeën	afwezig	1	
26	Plant: secundaire bloemhoofden	afwezig	1	
27	Plant: mate van secundaire bloemhoofden	-	-	
28	Bloem: kleur	geel	2	
29	Bloem: intensiteit geelkleur	licht tot gemiddeld	4	
30	Oogstrijpheid	zeer laat	9	tot laat
31	Begin bloei	-	-	
	Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans fysio	resistent	9	
	1			

Onderscheidbaarheid:

Staat op zichzelf. Het ras wordt gekenmerkt door het halfopgerichte, zeer zwak gebobbelde blad met sterke waslaag, het ronde, grijsgroene, middelvaste bloemhoofd en de zeer late tot late oogstrijpheid.

7. Denomination in trials:

Bejo 1744

Bijlage IV: Coronado

N E D E R L A N D **FORM II**
Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij - Bezuidenhoutseweg 73 - Den Haag

SUBJECT: Information according to article 11 par. 2 of the vegetable seed directive (70/458/CEE):
ADMISSION OF A NEW VARIETY

1. Species: Brassica oleracea L. convar. botrytis (L) Alef. var. cymosa Duch.
 - Broccoli
 2. Variety: Bordeaux
 3. Maintainer: NL 8c H Bejo Zaden B.V./Elso
 4. Date of admission: 17/08/2000
 5. Indication of the variety: b
 6. Short description of the variety:

UPOV richtlijn: TG/151/3

UPOV nr	Kenmerk	Klasse	Code	Opmerkingen
1	Plant: aantal stengels	één	1	
2	Plant: hoogte	zeer hoog	9	
3	Blad: houding	opgericht tot halfopgericht	2	
4	Blad: lengte	gemiddeld	5	
5	Blad: breedte	smal	3	
	Blad: vorm	smal elliptisch	3	
6	Blad: aantal lobben	zeer veel	9	
7	Bladschijf: kleur	blauwgroen	3	
8	Bladschijf: kleurintensiteit	zeer donker	9	
	Blad: waslaag	zeer sterk	9	
9	Bladschijf: anthocyaankleuring	afwezig	1	
10	Bladschijf: golving rand	gemiddeld	5	
11	Bladschijf: tanding rand	ondiep	3	
12	Bladschijf: bobbeling	zeer zwak tot zwak	2	
	Bladschijf: bobbelgrootte	zeer klein tot klein	2	
13	Bladsteel: anthocyaankleuring	aanwezig	9	
14	Bladsteel: lengte	kort	3	
15	Bloemhoofd: lengte vertakkingen aan basis	zeer lang	9	
16	Bloemhoofd: grootte	zeer klein	1	
17	Bloemhoofd: vorm	-	-	
18 G	Bloemhoofd: kleur	violet	5	
19	Bloemhoofd: kleurintensiteit	gemiddeld	5	
20	Bloemhoofd: anthocyaankleuring	aanwezig	9	
21	Bloemhoofd: intensiteit anthocyaankleuring	zeer sterk	9	
22	Bloemhoofd: bonkigheid	-	-	
23	Bloemhoofd: korreligheid	-	-	
24	Bloemhoofd: vastheid	zeer los	1	
25	Bloemhoofd: bracteeën	-	-	
26	Plant: secundaire bloemhoofden	aanwezig	9	
27	Plant: mate van secundaire bloemhoofden	zeer sterk	9	
28	Bloem: kleur	geel	2	
29	Bloem: intensiteit geelkleur	-	-	
30	Oogstrijpheid	zeer laat	9	
31	Begin bloei	zeer laat	9	
	Type	eenjarig	1	

Onderscheidbaarheid:

Staat op zichzelf. Het ras wordt gekenmerkt door de zeer hoge plant, het zeer donkerblauwgroene, zeer sterk gelobde, smalle blad met zeer kleine, paarse bloemhoofdjes (type purple sprouting broccoli).

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het verschaffen van een plant,
behorende tot de Brassica familie met hoge gehalten aan anti-
5 carcinogene glucosinolaten welke werkwijze omvat:

- a) het verschaffen van een Brassica oleracea
plant met een verhoogd gehalte aan
anti-carcinogene glucosinolaten in de
eetbare delen van de Brassica oleracea
10 plant;
- b) het gebruik van de onder a) verschaft
Brassica oleracea plant als uitgangsmateriaal
voor de veredeling van Brassica variëteiten
met hoge gehalten aan anti-carcinogene
15 glucosinolaten.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij de
anti-carcinogene glucosinolaten glucoiberine
(3-methylsulfinylpropylglucosinolaat (3MSPG)) en/of
20 glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat (4MSBG))
zijn.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarbij de
hoeveelheid glucoiberine (3-methylsulfinylpropylglucosinolaat
25 (3MSPG)) per 100 gram versgewicht eetbaar deel hoger is dan
100 micromol, de voorkeur geniet hoger dan 280 micromol, en
meer de voorkeur geniet hoger dan 390 micromol.

4. Werkwijze volgens conclusie 2, waarbij de
30 hoeveelheid glucorafanine (4-methylsulfinylbutylglucosinolaat
(4MSBG)) per 100 gram versgewicht eetbaar deel hoger is dan
50 micromol, de voorkeur geniet hoger dan 120 micromol, meer
de voorkeur geniet hoger dan 140 micromol.

5. Werkwijze volgens conclusies 1-4, waarbij de Brassica oleracea plant spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides) is.

5 6. Werkwijze volgens conclusie 5, waarbij de spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides) variëteit Bordeaux is.

10 7. Werkwijze volgens conclusies 1-4, waarbij de Brassica oleracea plant savooiekool (Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda) is.

15 8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij de savooiekool (Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda) variëteit Wirosa is.

20 9. Werkwijze volgens conclusies 1-4, waarbij de Brassica oleracea plant broccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa) is.

10. Werkwijze volgens conclusie 9, waarbij de broccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa) variëteit Belstar of Coronado is.

25 11. Werkwijze volgens conclusies 1-10, waarbij de plant behorende tot de Brassica familie wordt gekozen uit de groep welke bestaat uit bloemkool (Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis); romanesco (Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis); broccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa); spruitbroccoli (Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides); spruitkool (Brassica oleracea convar. oleracea var. gemmifera); witte kool (Brassica oleracea convar. capitata var. alba); spitskool

(Brassica oleracea convar. capitata var. alba); rode kool
 (Brassica oleracea convar. capitata var. rubra); savooiekool
 (Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda); koolrabi
 (Brassica oleracea convar. acephala var. gongyloides);
 5 boerenkool (Brassica oleracea convar. acephala var.
sabellica); en portugese kool (Brassica oleracea var.
tranchuda syn. costata).

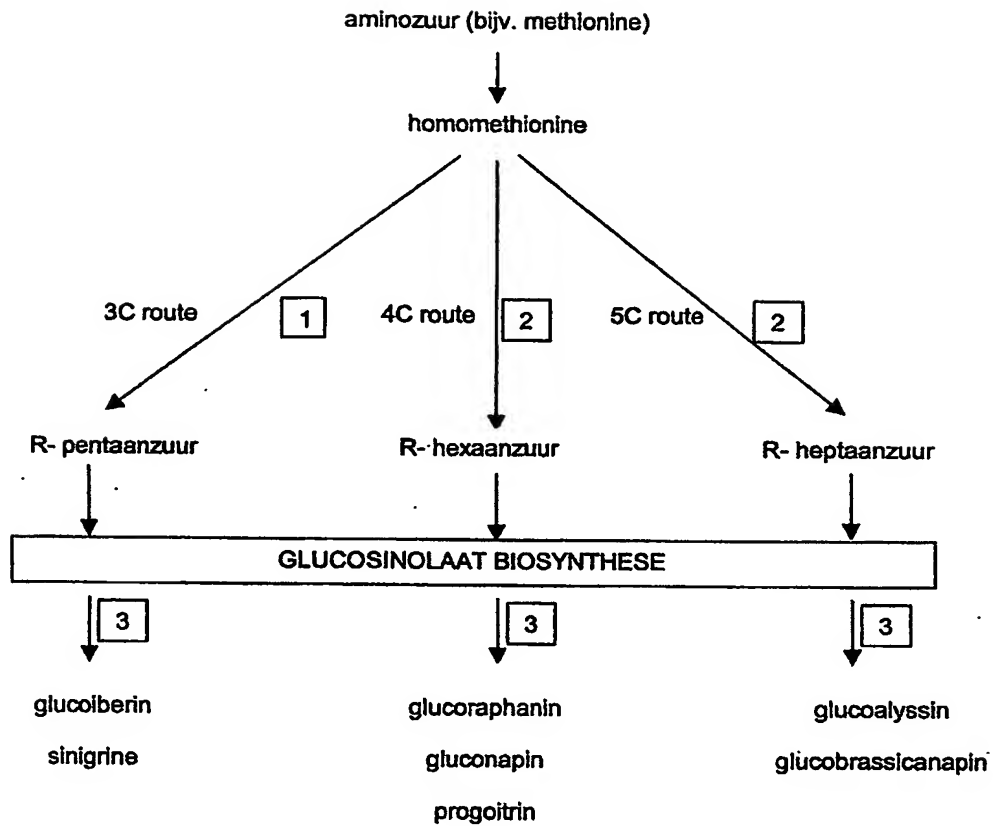
12. Plant behorende tot de Brassica familie
 10 verkrijgbaar volgens de werkwijze van één van de conclusies
 1-11.

13. Zaden van een plant behorende tot de Brassica
 familie verkrijgbaar volgens de werkwijze van één van de
 15 conclusies 1-11.

14. Plantdelen van een plant behorende tot de
Brassica familie verkrijgbaar volgens de werkwijze van één
 van de conclusies 1-11.

20 15. Het gebruik van de plant, zaden of plantdelen
 volgens één van de conclusies 12-14 voor de bereiding van een
 voedselproduct en/of farmaceutische samenstelling voor de
 profylaxis en/of behandeling van kanker.

Fig 1



1: BoGLS-PRO
2: BoGLS-ELONG
3: BoGSL-OXID